

07.07.95

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

08/817084

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1994年10月 7日

REC'D 04 SEP 1995

出 願 番 号
Application Number:

平成 6年特許願第244035号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

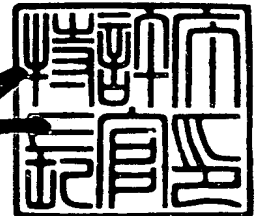
中外製薬株式会社
岸本 忠三

PRIORITY DOCUMENT

1995年 8月18日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

清川 佑二



出証番号 出証特平07-3048147

【書類名】 特許願

【整理番号】 944195

【提出日】 平成 6年10月 7日

【あて先】 特許庁長官 高島 章 殿

【国際特許分類】 A61K 39/395

【発明の名称】 I L-6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社 御殿場研究所内

【氏名】 三原 昌彦

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社 御殿場研究所内

【氏名】 守屋 陽一郎

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社 御殿場研究所内

【氏名】 大杉 義征

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府富田林市中野町3-5-31

【氏名】 岸本 忠三

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代表者】 永山 治

【特許出願人】

【識別番号】 000157865

【氏名又は名称】 岸本 忠三

【代理人】

【識別番号】 100077517

【郵便番号】 105

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル
青和特許法律事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-3504-0721

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

特平 6-244035

【包括委任状番号】 9207941

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 IL-6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インターロイキン-6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項2】 前記インターロイキン-6 アンタゴニストが慢性関節リウマチにおいて滑膜細胞の異常な増殖を抑制することを特徴とする請求項1の慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項3】 前記インターロイキン-6 アンタゴニストがインターロイキン-6 に対する抗体であることを特徴とする請求項1の慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項4】 前記インターロイキン-6 がヒトインターロイキン-6 であることを特徴とする請求項2の慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項5】 前記インターロイキン-6 アンタゴニストがインターロイキン-6 レセプターに対する抗体であることを特徴とする請求項1の慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項6】 前記インターロイキン-6 レセプターがヒトインターロイキン-6 レセプターであることを特徴とする請求項2の慢性関節リウマチ治療剤。

【請求項7】 インターロイキン-6 アンタゴニストを有効成分とする滑膜細胞増殖抑制剤。

【請求項8】 前記インターロイキン-6 アンタゴニストがインターロイキン-6 抗体又はインターロイキン-6 レセプター抗体である、請求項7に記載の滑膜細胞増殖抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明はインターロイキン-6 アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤又は滑膜細胞増殖抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

慢性関節リウマチは、関節内において滑膜組織などの結合組織の異常な増殖がみられる全身性の慢性炎症疾患である (Melnykら、Arthritis Rheum. 33:493-500, 1990)。慢性関節リウマチ患者の関節では、滑膜細胞の著明な増殖、滑膜細胞の異常な増殖による多層構造の形成 (pannus形成)、滑膜細胞の軟骨組織や骨組織への侵潤、滑膜組織への血管新生およびリンパ球やマクロファージといった炎症細胞の浸潤などが認められる。慢性関節リウマチの発症の機序として、これまで遺伝、細菌感染あるいは各種のサイトカインや成長因子の関与が報告されているが、いまだその発症のメカニズムは不明である。

【0003】

最近では、慢性関節リウマチ患者の滑膜および滑液中にはインターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-8 (IL-8)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、トランスフォーミング成長因子 β (TGF β)、線維芽細胞成長因子 (FGF) および血小板由来成長因子 (PDGF) 等のサイトカインまたは成長因子が検出されたとの報告があり (Nourira、Clin. Exp. Immunol. 55:295-302, 1984, Thorntonら、Clin. Exp. Immunol. 86:79-86, 1991, Saxneら、Arthritis Rheum. 31:1041-1045, 1988, Seitzら、J. Clin. Invest. 87:463-469, 1991, Lafyatisら、J. Immunol. 143:1142-1148, 1989, Melnykら、Arthritis Rheum. 33:493-500, 1990)

【0004】

特に、IL-1, TNF α およびPDGFが有力な滑膜増殖因子であると考えられている (Thorntonら、Clin. Exp. Immunol. 86:79-86, 1991, Lafyatisら、J. Immunol. 143:1142-1148, 1989, Gitterら、Immunology 66:

196-200, 1989)。また、IL-1やTNFの刺激により滑膜細胞がインターロイキン-6 (IL-6) を産生することが示唆されている (Itôら、Arthritis Rheum. 35:1197-1201, 1992)。

【0005】

IL-6はB細胞刺激因子2あるいはインターフェロン β 2と呼称されたサイトカインである。IL-6はBリンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され (Hirano, T. ら、Nufure 324, 73-76, 1986)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能をサイトカインであることが明らかになった (Akira, s. ら、Adv. in Immunology 54, 1-78, 1993)。IL-6は、細胞上で二種のタンパク質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80KDのリガンド結合性タンパク質、IL-6レセプター (IL-6R) である。

【0006】

IL-6Rは、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6R (sIL-6R) としても存在する。もう一つは非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130KDのgp130である。IL-6とIL-6RはIL-6/IL-6R複合体を形成し、次いでもう一つの膜タンパク質gp130と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞に伝達される (Tagaら、J. Exp. Med. 196:967, 1987)。

【0007】

慢性関節リウマチ患者の血清あるいは滑液には、過剰な量のインターロイキン-6 (IL-6) と可溶性IL-6レセプター (sIL-6R) が存在することが報告され (Houssiauら、Arthritis Rheum. 31:784-788, 1988, Hiranoら、Eur. J. Immunol. 18:1797-1801, 1988, Yoshiokaら、Japn. J. Rheumatol. in press)、関節リウマチモデル動物でも同様の結果が得られている (Takaiら、Arthritis Rheum. 32:594-600, 1989, Leistenら、Clin. Immunol. Immu

nopathol. 56:108-115, 1990) ことからIL-6が慢性関節リウマチとなんらかの係わりを有すると推察されている。

【0008】

さらに、特開平4-89433には、IL-6産生を強く促進するペプチドが慢性関節リウマチの治療に有効であることが開示されている。

一方、Higakiらは、慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞はIL-6に対する増殖反応が低く、IL-6が滑膜の増殖に対して抑制的に働くとしている(臨床免疫、22:880-887, 1990)。このように、IL-6と慢性関節リウマチの関係については相反する結果が報告されており、未だその関係は解明されていない。

【0009】

最近、Wendlingらは、抗IL-6抗体を慢性関節リウマチ患者に投与し、一時的に臨床的、生物学的な症状が改善されると同時に、血清中のIL-6レベルが上昇することを報告している(J. Rheumatol. 20:259-262, 1993)。

これらの報告では、IL-6が慢性関節リウマチ滑膜細胞の増殖を促進しているか、あるいは抑制的に作用するのかについてはなんらデータもなく、慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞に対してIL-6が直接関与しているか否かは依然として不明であった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

これまで関節リウマチの治療には、抗炎症剤であるコルチコステロイドなどのステロイド剤が使用されていたが、これらを長期的に使用すると皮膚組織の損傷や副腎皮質の機能抑制といった好ましくない副作用が生ずることから副作用が少ない薬剤の登場が待たれていた。

本発明の目的は、前記の欠点を有さない新しい慢性関節リウマチ治療剤を提供することである。より詳しくは、本発明はインターロイキン-6アンタゴニストを有効成分とし、慢性関節リウマチの滑膜細胞の異常増殖抑制剤、及びこの作用を有する慢性関節リウマチ治療剤を提供する。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、IL-6の関節リウマチ由来の滑膜細胞に対する役割を鋭意研究してきたが、IL-6だけでは関節リウマチ由来滑膜細胞の増殖が認められなかったことから、IL-6以外の因子について検索した結果、IL-6単独では滑膜細胞の増殖作用をほとんど示さないのに対し、IL-6と可溶性IL-6Rの共存下では、強力な滑膜細胞増殖作用を持つこと、さらには、この滑膜細胞増殖作用がIL-6抗体あるいはIL-6R抗体といったIL-6活性を阻害するアンタゴニストを添加することにより抑制されることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明はIL-6アンタゴニストを有効成分として含有する慢性関節リウマチ治療剤に関する。より詳しくは、本発明はIL-6アンタゴニストを有効成分として含有する滑膜細胞の異常な増殖を抑制する慢性関節リウマチ治療剤に関する。本発明はさらに、IL-6アンタゴニストを有効成分とする滑膜細胞増殖抑制剤に関する。

【0012】

【具体的な説明】

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストは、IL-6によるシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害するものであれば、その由来を問わない。IL-6アンタゴニストとしては、IL-6抗体、IL-6R抗体、gp130抗体、IL-6改変体、IL-6RのアンチセンスあるいはIL-6またはIL-6Rの部分ペプチド等が挙げられる。

【0013】

本発明でアンタゴニストとして使用される抗体、たとえば、IL-6抗体、IL-6R抗体、あるいはgp130抗体はその由来および種類（モノクローナル、ポリクローナル）を問わないが、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。これら抗体はIL-6、IL-6Rあるいはgp130と結合することにより、IL-6とIL-6RまたはIL-6Rとgp130の結合を阻害してIL-6のシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する抗体であ

る。

【0014】

モノクローナル抗体の産生細胞の動物種は哺乳類であれば特に制限されず、ヒト抗体またはヒト以外の哺乳動物由来であってよい。ヒト以外の哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、その作成の簡便さからウサギあるいはげっ歯類由来のモノクローナル抗体が好ましい。げっ歯類としては、特に制限されないが、マウス、ラット、ハムスターなどが好ましく例示される。

【0015】

このような抗体は、IL-6抗体としては、MH166 (Matsudaら、Eur. J. Immunol. 18:951-956, 1988) やSK2抗体 (Satoら、第21回日本免疫学会総会、学術記録、21:116, 1991) 等が挙げられる。IL-6R抗体としては、PM-1抗体 (Hirataら、J. Immunol. 143:2900-2906, 1989)、AUK12-20抗体、AUK64-7抗体あるいはAUK146-15抗体 (国際特許出願公開番号WO92-19759) などが挙げられる。gp130抗体としては、AM64抗体 (特開平3-219894) が挙げられる。

【0016】

モノクローナル抗体は、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作成できる。すなわち、IL-6、IL-6Rあるいはgp130を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作成できる。

【0017】

より具体的には、モノクローナル抗体を作成するには次のようにすればよい。例えば、前記感作抗原としては、ヒトIL-6の場合、Hiranoら、Nature, 324:73, 1986に開示されたヒトIL-6の遺伝子配列を用いることによって得られる。ヒトIL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清

中から目的の I L - 6 タンパク質を精製し、この精製 I L - 6 タンパク質を感作抗原として用いればよい。

【0018】

ヒト I L - 6 R の場合、欧州特許出願公開番号 E P 3 2 5 4 7 4 号に開示された遺伝子配列を用いて上記ヒト I L - 6 と同様の方法に従えば I L - 6 R タンパク質を得ることができる。I L - 6 R は細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱している可溶性のもの (s I L - 6 R) との二種類がある。s I L - 6 R は細胞膜に結合している I L - 6 R の主に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型 I L - 6 R と異なっている。

【0019】

ヒト g p 1 3 0 の場合、欧州特許出願公開番号 E P 4 1 1 9 4 6 に開示されている遺伝子配列を用いて上記 I L - 6 と同様の方法に従えば、g p 1 3 0 タンパク質を得ることができる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ等が使用される。

【0020】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を P B S (P h o s p h a t e - B u f f e r e d S a l i n e) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量併用して、哺乳動物に 4 - 2 1 日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0021】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3 x 63 Ag 8. 653) (J. Immunol. 123:1548, 1978), p3-U1 (Current Topics in Microbiology and Immunology 81:1-7, 1978), NS-1 (Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976), MPC-11 (Cell, 8:405-415, 1976), SP2/0 (Nature, 276:269-270, 1978), FO (J. Immunol. Meth. 35:1-21, 1980), S194 (J. Exp. Med. 148:313-323, 1978), R210 (Nature, 277:131-133, 1979) 等が好適に使用される。前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Milsteinら、Methods Enzymol. 73:3-46, 1981) 等に準じて行うことができる。

【0022】

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

【0023】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEGを通常、培養液に30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される

。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0024】

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が行われる。

【0025】

このようにして作成されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0026】

さらに、前記の方法により得られるモノクローナル抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法等の通常の前製手段を利用して高純度に前製することができる。

このようにして、作成されるモノクローナル抗体は、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA, ELISA）、蛍光抗体法（Immunofluorescence Analysis）等の通常の前疫学的手段により抗原を高感度かつ高精度で認識することを確認することができる。

【0027】

本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体に限られるものではなく、ヒトに対する異種抗原性を低下させるこ

と等を目的として人為的に改変したものであってよい。例えば、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウスのモノクローナル抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域とからなるキメラ抗体を使用することができ、このようなキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法、特に遺伝子組換技法を用いて製造することができる。

【0028】

さらに、再構成 (reshaped) したヒト抗体を本発明に用いることができる。これはヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域をヒト抗体の相補性決定領域へ置換したものであり、その一般的な遺伝子組換手法も知られている。その既知方法を用いて、本発明に有用な再構成ヒト型抗体を得ることができる (例えば、国際特許出願公開番号WO92-19759を参照)。

【0029】

なお、必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク (FR) 領域のアミノ酸を置換してもよい (Satoら、Cancer Res. 53:851-856, 1993)。さらには抗原に結合し、IL-6の活性を阻害するかぎり抗体の断片、たとえば、FabあるいはFv、H鎖とL鎖のFvを一本鎖となるよう適当なりンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) をコードする遺伝子を構築し、これを適当な宿主細胞で発現させ、前述の目的に使用することができる。

(例えば、Birdら、TIBTECH, 9:132-137, 1991; Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988を参照)。

【0030】

本発明で使用されるIL-6改変体としてはBrakenhoffら、J. Biol. Chem. 269:86-93, 1994あるいはSavinoら、EMBO J. 13:1357-1367, 1994に開示されたものが挙げられる。

IL-6改変体としては、IL-6のアミノ酸配列中に置換、欠失、挿入といった変異を導入することにより、IL-6Rとの結合活性を維持したまま、IL-6のシグナル伝達作用がないものが使用される。さらにその由来となるIL-

6は上記の性質を有する限り、その動物種を問わないが、抗原性を考慮すればヒト由来のものを使用するのが好ましい。

【0031】

具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriendら、J. Mol. Graphics, 8: 52-56, 1990) を用いてその二次構造を予測し、さらに変異アミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適当な変異アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR (ポリメレースチェインリアクション) 法により変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、大腸菌細胞や哺乳類細胞で発現させ、培養上清中に含まれたまま、あるいは通常の手法により、これを単離精製し、IL-6Rに対する結合活性およびIL-6のシグナル伝達の中和活性を評価することができる。

【0032】

本発明で使用されるIL-6部分ペプチドあるいはIL-6R部分ペプチドは、各々IL-6RあるいはIL-6に結合し、IL-6の活性伝達作用がないものであれば、その配列を問わない。IL-6部分ペプチドおよびIL-6R部分ペプチドについては、米国特許公報US 5210075を参照のこと。IL-6Rアンチセンスオリゴヌクレオチドについては特願平5-300338を参照のこと。

本発明のIL-6アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤は、IL-6のシグナル伝達を遮断し、IL-6により惹起された滑膜細胞の異常な増殖が抑制される限り、これが関与する慢性関節リウマチの治療に有効である。

【0033】

本発明の慢性関節リウマチ治療剤は、好ましくは非経口的に、たとえば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に投与することができる。さらに、少なくとも一種の医薬用担体または希釈剤とともに

医薬組成物やキットの形態をとることができる。

本発明の慢性関節リウマチ治療剤のヒトに対する投与量は患者の病態、年齢あるいは投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、およそ1-1000mg/患者の範囲で4回以下の分割容量を選択することができる。しかしながら、本発明の関節リウマチ治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

【0034】

本発明の関節リウマチ治療剤は常法にしたがって製剤化することができる。たとえば、注射用製剤は、精製されたIL-6アンタゴニストを溶剤、たとえば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに、吸着防止剤、たとえば、Tween 80、ゼラチン、ヒト血清アルブミン(HSA)などを加えたものであり、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することができる。

【0035】

【実施例】

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1. ヒト可溶性IL-6レセプターの調製

Yamasakiらの方法(Science, 241:825-828, 1988)に従い得られたヒトIL-6レセプター(IL-6R)をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)法により可溶性IL-6Rを作成した(Yasukawaら、J. Biochem. 108:673-676, 1990)。

【0036】

上記プラスミドpBSF2R.236を制限酵素Sph Iで消化して、IL-6R cDNA断片を得、これをmp18(Amersham製)に挿入した。IL-6R cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーATATTCTCTAGAGAGATTCTを用いて、インビトロミュ

ータジェネシスシステム (Amersham製) により、PCR法でIL-6 RcDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345の位置に導入され、可溶性IL-6 R (sIL-6 R) をコードするcDNAが得られた。

【0037】

sIL-6 RcDNAをCHO細胞で発現するために、dihydrofolate reductase (dhfr) をコードするcDNAが制限酵素PvuI切断部位に挿入されたプラスミドpECEdhfr (Clauserら、Cell, 45:721-735, 1986) にHindIII-SalIで切断した上記sIL-6 RcDNAを挿入し、CHO細胞発現プラスミドpECEdhfr344を得た。

【0038】

10 μ gのプラスミドpECEdhfr344をdhfr⁻ CHO細胞株DXB-11 (Urlandら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, 1980) ヘカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chenら、Mol. Cell. Biol. 7:2745-2751, 1987) により、トランスフェクトした。

【0039】

トランスフェクトしたCHO細胞を1mMグルタミン、10%透析Fetal Calf Serum (FCS)、100 U/mlのペニシリンおよび100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含 α MEM選択培養液で3週間培養した。選択されたCHO細胞を限界希釈法でスクリーニングし、一つの単一CHO細胞クローンを得た。このCHO細胞クローンを20 nM~200 nMの濃度のメトトレキセート (MTX) で増幅し、ヒトsIL-6 R産生CHO細胞株5E27を得た。

【0040】

CHO細胞株5E27を5%FCSを含むイスコーブ改変ダルベコ培養液 (IMDM, Gibco製) で培養し、その培養上清を回収し、培養上清中のsIL-6 Rの濃度をELISA (Enzyme-Linked Immunosor

bent Assay) 法にて常法にしたがい測定した。

【0041】

参考例2. ヒトIL-6抗体の調製

Matsudaらの方法 (Eur. J. Immunol. 18:951-956, 1988) により、ヒトIL-6抗体を調製した。

10 μ gの組換え型IL-6 (Hiranoら、Immunol. Lett., 17:41, 1988) をフロイント完全アジュバントとともにBALB/cマウスを免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれが続けた。

【0042】

局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT培養液を用いるOiらの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。

【0043】

すなわち、柔軟なポリビニル製の96ウェルマイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製、Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH9.6) 中で100 μ lのヤギ抗マウスIg抗体 (10 μ l/ml, Cooper Biomedical, Inc 製 Malvern, PA) により4℃で一晩コートした。次いで、プレートを100 μ lの1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSにより室温で2時間処理した。これをPBSで洗浄した後、100 μ lのハイブリドーマ培養上清を各ウェルへ加え、4℃にて一晩インキュベートした。

【0044】

プレートを洗浄して、2000 cpm / 0.5 ng / ウェルとなるように125 I

標識組換型IL-6を各ウェルへ添加し、洗浄した後各ウェルの放射活性をガンマカウンター(Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA)で測定した。216個のハイブリドーマクローンのうち32個のハイブリドーマクローンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定なMH166・BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生するIL-6抗体MH166はIgG1 κ 型のサブタイプを有する。

【0045】

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマ細胞株MH60・BSF2(Matsudaら、Eur. J. Immunol. 18:951-956, 1988)を用いてMH166抗体によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH60・BSF2細胞を 1×10^4 / $200 \mu\text{l}$ / ウェルとなるように分注し、これにMH166抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、15.1 Ci / mmolの ^3H チミジン(New England Nuclear, Boston, MA)を加えた後、更に6時間培養を続けた。

【0046】

細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター(Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan)で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。その結果、MH166抗体はIL-6により誘導されるMH60・BSF2細胞の ^3H チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

【0047】

参考例3. ヒトIL-6レセプター抗体の調製

Hirataらの方法(J. Immunol., 143:2900-2906, 1989)により作成した抗IL-6R抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B(Pharmacia Fine Chemicals製、Piscataway, NJ)と添付の処方にしたがって結合させ、これを用いてIL-6R(Yamasakiら、Science 241:825-8

28, 1988) を精製した。

【0048】

ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製)、10mMトリエタノールアミン (pH7.8) および0.15M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫に用いる部分精製IL-6Rとした。

【0049】

BALB/cマウスを 3×10^9 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6Rで10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性ウェルからのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6Rへの結合活性を調べた。 5×10^7 個のU266細胞を ^{35}S -メチオニン (2.5 mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により ^{35}S -メチオニン標識IL-6Rを流出させ、0.025mlの1M Tris (pH7.4) で中和した。

【0050】

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein Gセファロース (Pharmacia製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの ^{35}S 標識IL-6R溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6Rと反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生されるIL-6R抗体PM-1は、IgG1 κ 型のサブタイプを有する。

【0051】

ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6Rに対するIL-6の

結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換え型IL-6を大腸菌より調製し(Hiranoら、Immunol. Lett., 17:41, 1988)、ボルトン-ハンター試薬(New England Nuclear, Boston, MA)により¹²⁵I標識した(Tagaら、J. Exp. Med. 166:967, 1987)。

【0052】

4×10^5 個のU266細胞を100倍量の過剰な非標識IL-6の存在下で室温にて、1時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の培養上清および14000 cpm の¹²⁵I標識IL-6とともに培養した。70 μ lのサンプルを、400 μ lのマイクロフュージポリエチレンチューブに入れた300 μ lのFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6Rに対する結合を阻害することが明らかとなった。

【0053】

実験例1. 慢性関節リウマチ由来滑膜細胞の樹立

(1) 滑膜細胞の調製

慢性関節リウマチ患者の関節を外科的に処置する際、滑膜組織を得た。滑膜組織をハサミにより細切し、ついで5mg/mlのTYPE Iコラーゲナーゼ(Sigma Chemical Co製)および0.15mg/mlのウシ脾臓由来DNase(Sigma Chemical Co製)によりIMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium)培養液中で、37℃1時間インキュベートすることで酵素的に分解し、メッシュを通して単一細胞を得た。得られた細胞を細胞培養用のフラスコ中で5%FCS添加IMDM培養液を用いて一晩培養した後、非付着性細胞を除去し滑膜細胞を得た。この滑膜細胞を、三継代から六継代培養したものを下記の実験に使用した。

【0054】

(2) 滑膜細胞によるIL-6産生

上記で得られた滑膜細胞を 3×10^3 個/ウェルとなるように5%FCS(Hyclone Laboratories Inc製)、10U/mlのペニシリ

ンGおよび100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むIMDM培養液で懸濁した後、96ウェルマイクロタイタープレート（Falcon製）に分注し、ヒトインターロイキン-1 β （IL-1 β ）、ヒト腫瘍壊死因子 α （TNF α ）、ヒト血小板由来成長因子（PDGF）ABおよびヒト塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）を各々0.01または0.1、0.1または1、1または10、及び1または10ng/mlの濃度になるように加え、37℃にて72時間培養し、その培養上清を回収した。

【0055】

100 μ lの抗ヒトIL-6抗体MH166（1 μ g/ml）を96ウェルELISAプレート（Immunoplate；Nunc製）に加え、4℃にて24時間インキュベートした。ついで、各ウェルを0.05% Tween 20を含むPBSにより洗浄して、1% BSAを含むPBSで一晩4℃でブロッキングした。次いで、上記で得られた培養上清を1% BSAを含むPBSで希釈し、各ウェルへ添加した後、室温にて2時間インキュベートした。0.05%のTween 20を含むPBSで洗浄の後、100 μ lのプロテインAカラム（Pharmacia製）で精製した2.5 μ g/mlの精製ウサギポリクローナル抗ヒトIL-6抗体を加えた。

【0056】

室温で2時間インキュベートした後、培養上清中のIL-6に結合したウサギポリクローナル抗IL-6抗体をアルカリフォスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体（Tago製）を反応させた後、添付の処方にしたがって1mg/mlのSigma 104アルカリフォスファターゼ基質（Sigma製）を加え、マイクロプレートリーダーMPR A4（Tosoh Co製）により405-600nmの吸光度を測定した。

吸光度のOD値をヒトIL-6の濃度へ変換するために、各アッセイ時に組換え型IL-6を用いて検量線を作成した。結果を表1に示す。

【0057】

【表1】

滑膜細胞によるIL-6産生増強

| 処 理 (ng/ml) | | IL-6 (ng/ml) |
|--------------|------|----------------|
| 無添加 | | 0.096 ± 0.012 |
| IL-1 β | 0.01 | 6.743 ± 0.178 |
| | 0.1 | 17.707 ± 0.259 |
| TNF α | 0.1 | 0.575 ± 0.008 |
| | 1 | 1.688 ± 0.034 |
| PDGF-AB | 1 | 0.163 ± 0.035 |
| | 10 | 0.165 ± 0.016 |
| bFGF | 1 | 0.181 ± 0.009 |
| | 10 | 0.230 ± 0.019 |

注 滑膜細胞をIL-1 β , TNF α , PDGF-ABまたはbFGFと共に3日間培養した。培養後、上清中のIL-6濃度をELISAにより測定した。

【0058】

その結果、IL-1 β は、滑膜細胞のIL-6産生を強く促進することが明らかとなった。

【0059】

実施例1.

(1) 実験例1で得られた滑膜細胞 (3×10^3 /ウェル) を5% FCS (Hyclone Laboratories Inc製)、10U/mlのペニシリンGおよび100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むIMDM培養液中で懸濁

した後、96ウェルマイクロタイタープレート(#3072; Falcon製)に分注し、5日間、各種の濃度のIL-6, sIL-6R各々単独存在下、あるいはIL-6とsIL-6Rの共存下で培養した。培養開始後72時間後に1 μ Ci/ウェルとなるように³Hチミジン(Amersham International plc製)を各ウェルに添加し、培養終了後にシンチレーションカウンターにより細胞内の放射活性を測定した。結果を図1に示す。

【0060】

その結果、IL-6あるいはsIL-6R単独では、滑膜細胞の³Hチミジンとりこみは低く、滑膜細胞の増殖が認められなかった。これに対し、10 ng/ml以上の濃度のIL-6と100 ng/mlの濃度のsIL-6Rの共存下ではコントロール群に比し、顕著な³Hチミジンとりこみがみられた。したがって、IL-6単独では滑膜細胞の増殖作用をほとんど示さないのに対し、IL-6とsIL-6Rの共存下では、強力な滑膜細胞増殖作用を持つことが明らかとなった。

【0061】

(2) 滑膜細胞(3×10^3 /ウェル)を、IL-6を産生させるに十分量のIL-1 β (0.1 ng/ml)、100 ng/mlのsIL-6Rおよび25 μ g/mlのIL-6抗体あるいは25 μ g/mlのIL-6R抗体存在下で培養した。培養開始72時間後に1 μ Ci/ウェルとなるように³Hチミジンを添加し、培養終了後にシンチレーションカウンターで細胞内の放射活性を測定した。結果を図2に示す。IL-6抗体あるいはIL-6R抗体の添加により、sIL-6Rにより増強された滑膜細胞の増殖を完全に抑制した。

【0062】

(3) 滑膜細胞(3×10^3 個/ウェル)を、100 ng/mlのIL-6(Genzyme社製)、上記参考例にて得られた100 ng/mlのsIL-6Rおよび25 μ g/mlのIL-6抗体またはIL-6R抗体の存在下で培養した。培養開始後72時間に1 μ Ci/ウェルとなるように³Hチミジンを添加し、培養終了後にシンチレーションカウンターで細胞内の放射活性を測定した。結果を図3に示す。IL-6抗体あるいはIL-6R抗体の添加により、sIL-6Rにより増強された滑膜細胞の増殖は完全に抑制された。

【0063】

【発明の効果】

慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞はIL-6とsIL-6Rが共存する時に増殖する。慢性関節リウマチ患者の滑液中には滑膜細胞が増殖するのに十分な量のIL-6とsIL-6Rが存在することから、IL-6によるシグナル伝達が慢性関節リウマチの滑膜細胞の異常な増殖に関与していることが示された。

本発明のIL-6アンタゴニストを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤はIL-6とsIL-6Rの共存下で慢性関節リウマチ由来滑膜細胞の増殖を抑制し、慢性関節リウマチの治療効果を有することが証明される。したがって、本発明のIL-6アンタゴニストは、滑膜細胞の異常な増殖がみられる慢性関節リウマチの治療剤として期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、IL-6またはsIL-6R単独存在下、あるいはIL-6およびsIL-6R共存下での滑膜細胞の³Hチミジン取込み量を示す。

【図2】

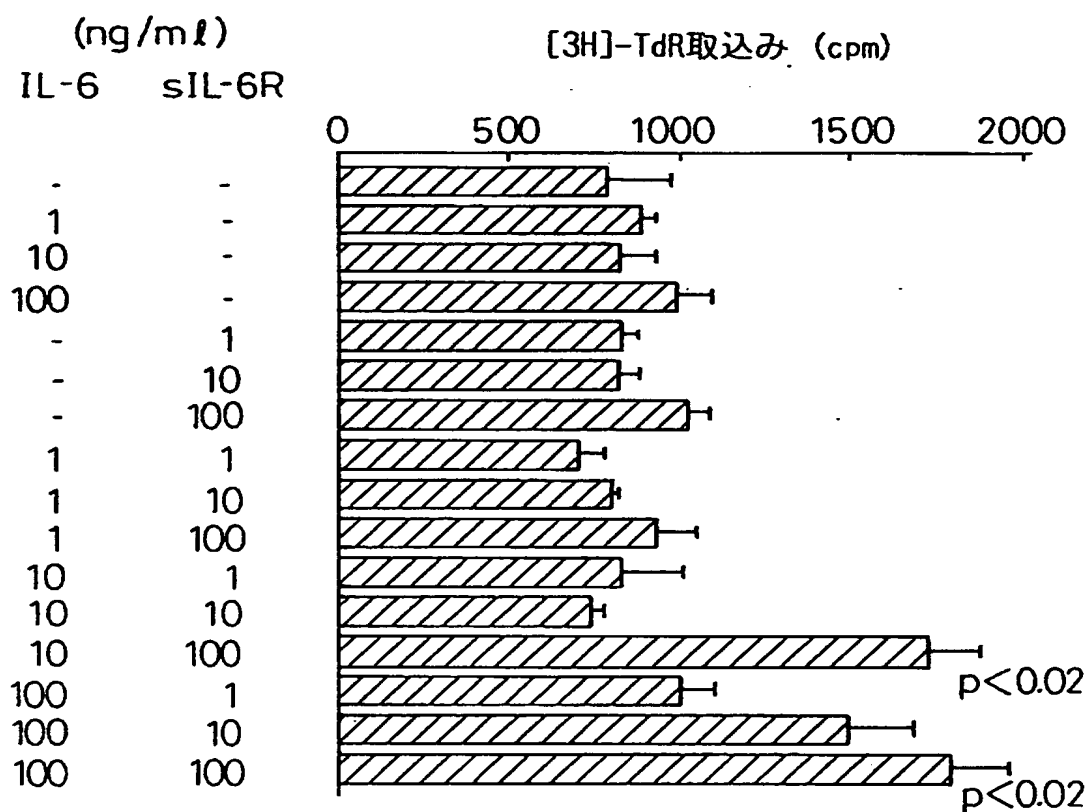
図2は、IL-1 β およびsIL-6R共存下におけるIL-6抗体あるいはIL-6R抗体添加時の滑膜細胞の³Hチミジン取込み量を示す。

【図3】

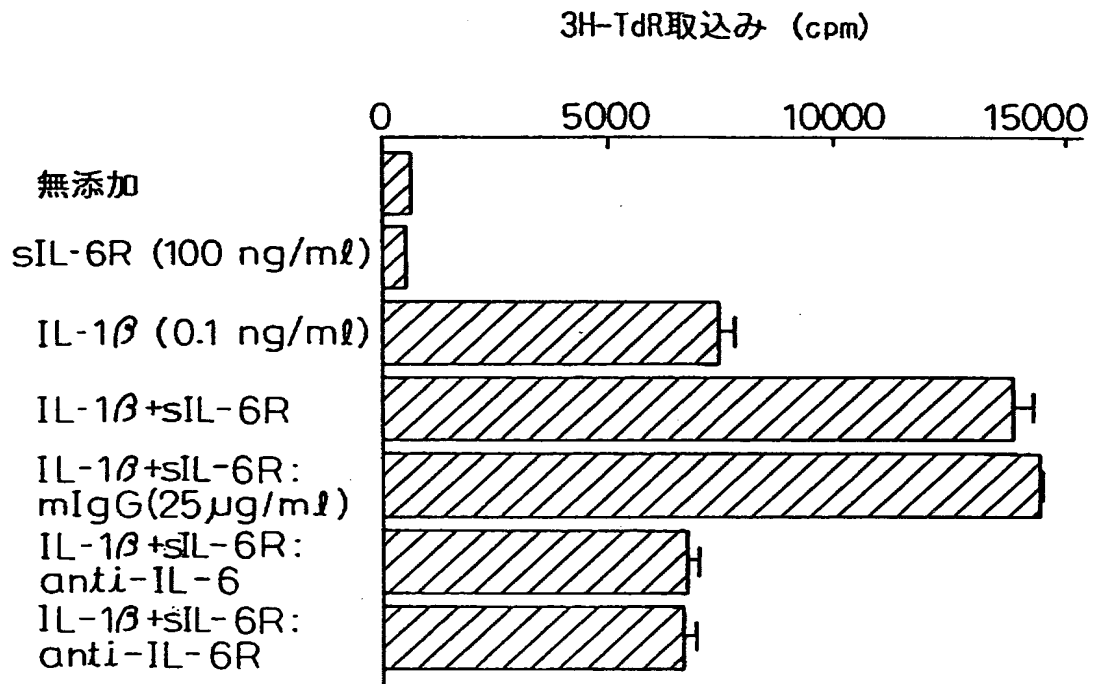
図3は、IL-6およびsIL-6R共存下におけるIL-6抗体あるいはIL-6R抗体添加時の滑膜細胞の³Hチミジン取込み量を示す。

【書類名】 図面

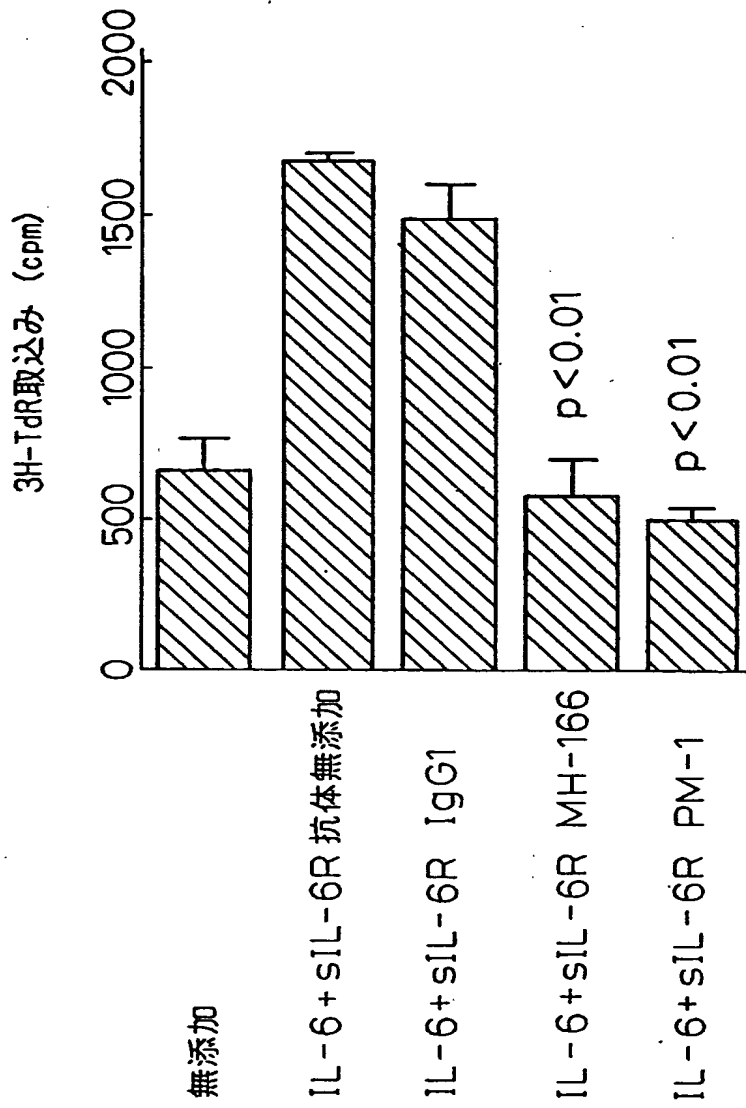
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 滑膜細胞増殖抑制剤、又は滑膜細胞増殖抑制に基く慢性関節リウマチ治療剤の提供。

【構成】 IL-6 アンタゴニスト、例えば IL-6 抗体、IL-6 R 抗体等を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤又は滑膜細胞増殖抑制剤。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000003311
 【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号
 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000157865
 【住所又は居所】 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号
 【氏名又は名称】 岸本 忠三

【代理人】

申請人
 【識別番号】 100077517
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所
 【氏名又は名称】 石田 敬

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所
 【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所
 【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所
 【氏名又は名称】 西山 雅也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

| | |
|----------|----------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 9月 5日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 東京都北区浮間5丁目5番1号 |
| 氏 名 | 中外製薬株式会社 |

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000157865]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

氏 名 岸本 忠三